

## ハロロドプシンの光反応ダイナミクスの研究

(京大院理<sup>\*</sup>, 北大院理<sup>\*\*</sup>, 北大院薬<sup>\*\*\*</sup>) 井上圭一<sup>\*</sup>, 久保恵美<sup>\*\*</sup>, 出村誠<sup>\*\*</sup>, 加茂直樹<sup>\*\*\*</sup>, 寺嶋正秀<sup>\*</sup>

【序】ハロロドプシン(hR)は古細菌の細胞膜中に存在する光受容タンパク質で、光子を吸収すると細胞外側から細胞質側へ細胞膜を通して塩化物イオンを輸送する。これは同じ古細菌型のロドプシタンパク質であり、幅広い研究が進んでいる光駆動型のプロトンポンプであるバクテリオロドプシンと比較すると、光サイクル一周期中で一つのイオンを輸送する点では同じであるが、輸送の方向が逆になっているという差異が見られる。これまでの研究からこれら二つのタンパク質の輸送の機構は基本的では同じであるものの、わずかなアミノ酸残基の違いにより輸送されるイオンの種類とその方向性が決定されていると考えられている。従って hR はイオン輸送タンパク質の分子論的な機構を調べる上で良いモデル系として期待され、幅広い研究がなされている。

本研究では hR の光反応ダイナミクスを調べるための主な実験手法として過渡回折格子法(TG法)を用いた。TG法ではタンパク質の光励起にともなう溶液の全体の屈折率変化を測定することができ、それを通してタンパク質全体の構造変化を時間分解で検出することが出来る。一般に光受容タンパク質のダイナミクスを調べる上で用いられている過渡吸収(TA)測定は発色団近傍の変化に対してのみ敏感であるが、TG法ではタンパク質全体の構造変化を測定することができることから、完全な反応ダイナミクスについての情報を与えると期待される。我々はこのTG法を用いることにより、hRの詳細な反応ダイナミクスの研究を行った。

【実験】試料として *Natronobacterium pharaonis* 由来のハロロドプシン(phR)を大腸菌を用いて発現し、界面活性剤(n-dodecyl  $\beta$ -D-maltopyranoside)に可溶化し、波長 560 nm で OD = 6.5としたものを用いた。ハロロドプシンのC末端側にはNiカラムを用いた精製のためにHisタグが数残基導入された。pHは50 mMのTris-HClでpH = 7.0とし、NaCl濃度は0.3 - 4 Mの間で変化させた。

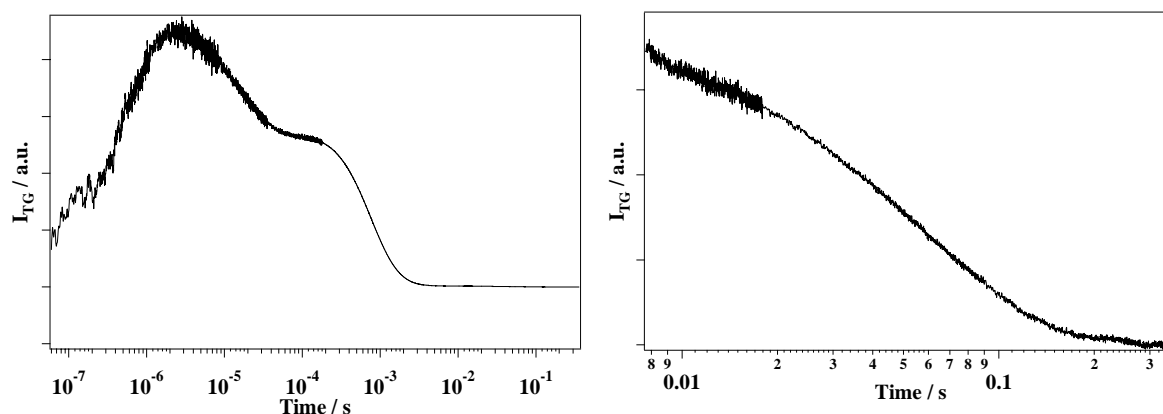


図1 phRの (a) 全体のTG信号, (b) 吸収変化の緩和後の長時間スケールにおけるTG信号

TG法の励起光にはNd:YAGレーザーの二倍波( $\lambda = 532 \text{ nm}$ )励起の色素レーザーから取り出した560 nmのパルス光を用いた。ビームスプリッターを用いて励起光を二つに分けた後、サンプル用液上で交差させた。励起光の強度は1-10  $\mu\text{J}/\text{pulse}$ とした。probe光には840 nmのダイオードレーザーの連続光を用い、二本の励起光の交差点へBragg条件を満足するように導入した。

基礎的な反応ダイナミクスを知るためにTG法と同様の実験条件でTA測定を行った。励起光は同じ560 nmの光を用い、probe光には594, 612, 633 nmの3つのHe-Neレーザーの連続光を用い、光電子増倍管を用いて信号を検出した。TA信号はこれら3つのtraceをglobal解析しそれぞれの変化成分の寿命を決定した。

【結果】*phR*のTA測定を行ったところ200  $\mu\text{s}$ 、500  $\mu\text{s}$ 、2.0 msの中間体を経て、基底状態へと緩和することが分かった。同様の条件下でTG測定を行ったところ、同じ時間領域に、これらの変化過程に対応する非常に強い信号が現れた(図1(a))。これは中間体の吸収スペクトルが基底状態と異なることに対応する強い屈折率変化を表す。さらにその後、吸収変化が完全に緩和している2 ms - 100 msの時間領域において弱い信号が観測された(図1(b))。発色団のスペクトルは基底状態に緩和していることから、この信号は*phR*タンパク質の基底状態からの部分モル体積変化( $\Delta V$ )によるものであり、タンパク質全体の構造がこの時間ではまだ完全に緩和していないことを示す。従って発色団の吸収変化を伴わない緩和過程(*phR'*  $\rightarrow$  *phR*)に対応すると帰属付けされた。熱的参照試料を用いた定量測定からNaClの濃度が1.5 Mの時には、この*phR'*中間体と基底状態の値は $\Delta V = 2.5 \text{ ml/mol}$ であると決定された。

現在は*phR*分子のより詳細な分子論的な機構を明らかにするため変異体を用いた更なる研究を行っている。用いた変異体として細胞外側にあり、基底状態で $\text{Cl}^-$ の結合サイトを形成すると考えられるArg 123残基をLys残基で置き換えたものと(R123K変異体)、細胞質側にあり、光サイクルの途中で $\text{Cl}^-$ イオンが細胞質へ放出される際の過渡的な $\text{Cl}^-$ 結合サイトを形成すると考えられているThr 218残基をValで置換したものと(T218V変異体)の2つを用いた。これらの残基を選択的に置換すると、光反応サイクルの塩化物イオンがタンパク質の細胞外側と細胞質側の結合サイトと相互作用する段階において、そのダイナミクスが野生型のものから変化することが期待され、特に今回初めて明らかになった*phR'*  $\rightarrow$  *phR*の過程における構造変化がタンパク質のどの箇所で行われているのかを明らかにすることが出来ると期待される。

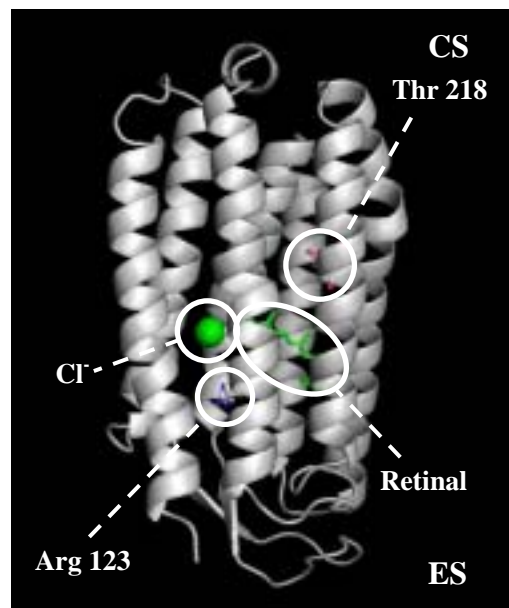


図2 変異を施した残基の分子中での位置